

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

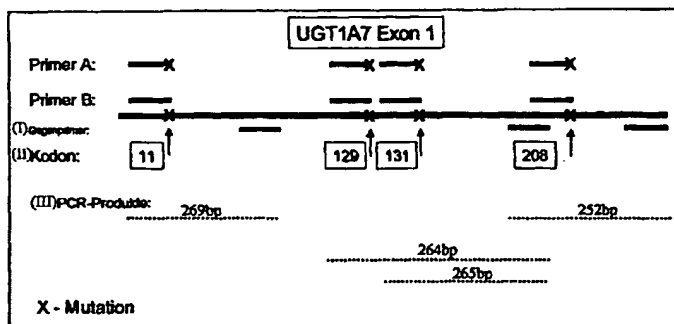
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053770 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00003 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MANNS, Michael
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Januar 2002 (03.01.2002) [DE/DE]; Sonnenallee 23, 30916 Isernhagen (DE).
STRASSBURG, Christian [DE/DE]; Drachenfeld 79,
30627 Hannover (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Gramm, Lins & Partner
GbR, Freundalle 13, 30173 Hannover (DE).
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DE (Gebrauchsmuster), DK, DM, DZ, EC,
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM,
PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PREDICTION OF THE RISK POTENTIAL FOR CANCEROUS DISEASES AND INFLAMMATORY INTESTINAL DISEASES AND CORRESPONDING TESTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VORHERSAGE DES GEFÄHRDUNGSPOTENTIALS FÜR KARZINOMERKRANKUNGEN UND ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN UND ZUGEHÖRIGE TESTS



- (I):- COUNTER PRIMER
(II):- CODON
(III):- PCR PRODUCTS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the prediction of the risk potential and/or diagnosis of cancerous diseases or inflammatory intestinal diseases, whereby a DNA sample is tested for the presence of polymorphic UGT1A7 allele. A positive result for a mutation is a positive indication of a sensitivity to cancerous diseases. A prediction of sensitivity to an inflammatory intestinal disease can similarly be made. A PCR amplification of the exon 1, by means of the DNA sample with subsequent sequence analysis is carried out in the method and the determined sequence compared with that of the wild type and the polymorphic allele. The presence or lack of mutations is monitored by means of sequencing the corresponding cDNA using automated fluorescent dye sequencing. The test arrangement for said method requires genetic detection reagents, namely the required primer or cDNAs, on a stationary support in a pre-prepared arrangement or sequence for reading off the results. The recombinant UGT1A7 enzymes are also used for therapeutic purposes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(57) **Zusammenfassung:** Bei dem Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials und/oder Diagnose von Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen wird eine DNA-Probe auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A7-Allele getestet. Ein positives Ergebnis für eine Mutation gilt als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomerkrankungen. Ebenso kann eine Vorhersage über eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung gemacht werden. Bei dem Verfahren wird durch die DNA-Probe eine PCR-Amplifikation des Exons 1 mit anschließender Sequenzanalyse durchgeführt und die ermittelte Sequenz mit der des Wildtyps und der polymorphen Allele verglichen. Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen wird durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung überprüft. Die Testanordnung für dieses Verfahren erfordert genetische Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge. Die rekombinanten UGT1A7-Enzyme werden auch für therapeutische Zwecke verwendet.

Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für Karzinomerkrankungen und entzündliche Darmerkrankungen und zugehörige Tests

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für Karzinomerkrankungen und entzündliche Darmerkrankungen und zur Diagnose dieser Erkrankungen. In erster Linie betrifft die Erfindung ein Verfahren für die Gefährdungspotential-Abschätzung für Kolorektalkarzinome. Ferner betrifft die Erfindung Tests für die Diagnostik an DNA-Proben eines zu untersuchenden
- 10 Individuums sowie die Verwendung neuer polymorpher Formen des UGT1A7-Gens für die metabolische Charakterisierung von Medikamenten, insbesondere von Tumorthapeutika.

- Man vermutet heute, dass das Risiko für Krebs durch eine genetische
- 15 Prädisposition und durch Umwelteinflüsse einschließlich dem Ausgesetztsein gegenüber krebserregenden Substanzen bestimmt wird.

- Es wurde daher schon häufiger ein Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen karzinogenmetabolisierender Enzyme und einer Krebsentstehung
- 20 vermutet. Konkrete, statistisch bestätigte Zusammenhänge sind jedoch schwer zu finden, da die Metabolisierung nicht mit einer Detoxifizierung gleichgesetzt werden kann. Für eine Krebsrisiko-Vorhersage genügt es daher nicht, überhaupt genetische Abwandlungen festzustellen, sondern es muss bekannt sein, dass die Veränderung zu deutlich negativen Folgen im Metabolismus führt.

- 25 Ein weiteres Problem beim Auffinden eines solchen Zusammenhangs besteht darin, dass der menschliche Stoffwechsel sehr komplex ist und eine Unzahl von Substanzen, darunter Stoffwechselprodukte, Proteine und gerade auch Enzyme als Marker für ein Krebsrisiko in Frage kommen könnten. Dies gilt auch für das Kolon- oder kolorektale Karzinom (CRC), eine der häufigsten Krebsarten der westlichen
- 30 Welt. Der menschliche Darm ist ein großes Organ, das durch vielerlei Körperprozesse und auch die Ernährung beeinflusst wird. Es musste daher fraglich sein, ob überhaupt eine eindeutige Risikoabschätzung aufgrund einer genetischen Veranlagung möglich ist.

- 2 -

Am Stoffwechsel im Darm sind eine Vielzahl von Enzymklassen beteiligt, darunter solche, die für die Verstoffwechselung von Fremdsubstanzen zuständig sind.

Die humane Uridindiphosphat(UDP)-5'-Glucuronosyltransferase (UGT) ist eine große Enzymklasse, die die Glukuronidierung zahlreicher Substrate bewirkt. Innerhalb dieser Superfamilie sind drei Familien mit besonderen Aufgaben identifiziert worden, UGT1, UGT2 und UGT8. Allein unter den Enzymen der Familie UGT1 unterscheidet man zahlreiche Isoformen. In der Leber wurden in den letzten 10 Jahren 5 Familie 1A UGT-Isoformen (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6 und 1A9) entdeckt und kloniert, darunter die Bilirubin-UGT-Isoform UGT1A1. Drei extrahepatische UGT1A- Genprodukte konnten aus Gallenwegen (UGT1A10), Magen (UGT1A7) und Kolon (UGT1A8) isoliert werden.

Die am menschlichen UGT1A7-Genort kodierten Proteine dienen durch die Glukuronidierung der Entgiftung einer Vielzahl endogener und exogener (xenobiotischer, d.h. schwer abbaubarer Verbindungen technischen Ursprungs) Verbindungen des menschlichen Körpers. Es sind Proteine des sogenannten Phase 2-Stoffwechsels des Menschen, der zum Beispiel die Acetylierung, Sulfatierung und Glukuronidierung umfasst. Für das 1996 erstmalig als Transkript beschriebene UGT1A7 konnte eine Detoxifikation von polycyclischen Kohlenwasserstoffen und heterozyklischen Aminen demonstriert werden. Diese Substanzen gelten auch als karzinogen.

In der WO 00/06776, ist die Identifizierung genetischer Polymorphismen in menschlichen UGT2B4-, UGT2B7- und UGT2B15-Genen offenbart, die die UGT2B-Aktivität ändern. UGT2-Enzyme sind u.a. bei der Steroid-Metabolisierung beteiligt. Nukleinsäuren, die die polymorphe UGT2-Sequenzen enthalten, wurden verwendet, um Patienten auf einen geänderten Metabolismus für UGT2B-Substrate, mögliche Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen und nachteilige Wirkungen/Nebenwirkungen, sowie auf Krankheiten, die von der Exposition gegenüber Umwelt- oder berufsbedingten Giften herrühren, durchzutesten. Mit Hilfe der Nukleinsäuren wurde Tier-, Zell- und in vitro Modelle für Wirkstoffmetabolismen etabliert.

- 3 -

- In der WO 99/57322 wurden genetische Polymorphismen im menschlichen UGT1 Gen identifiziert, welche den UGT1-abhängigen Wirkstoffmetabolismus verändern. Auch hier wurden die polymorphen Sequenzen verwendet, um Patienten auf einen geänderten Metabolismus für UGT1-Substrate, mögliche Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen und nachteilige Wirkungen/Nebenwirkungen, sowie auf Krankheiten, die von der Exposition gegenüber Umwelt- oder berufsbedingten Giften herrühren, durchzutesten. Mit Hilfe der Nukleinsäuren wurden wiederum Tier-, Zell und in vitro-Modelle für Wirkstoffmetabolismen etabliert.
- Es wurden des weiteren bereits funktionale Konsequenzen einer genetischen Veränderung des menschlichen UGT1A7-Gens beschrieben in "C. Guillemette, J. K. Ritter, D. J. Auyeung, F. K. Kessler, D. E. Housman; „Struktural hetreogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene", Pharmacogenetics, 2000, 10:629-644". Dabei wird auch die mögliche Rolle von UGT1A7 bei der Entgiftung und Eliminierung von karzinogenen Produkten in der Lunge diskutiert. UGT1A7 wird in der Lunge exprimiert, nicht jedoch im menschlichen Dickdarm.

- Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, einen konkreten Zusammenhang zwischen einem Krebsrisiko, insbesondere für Kolonkarzinom (Kolonkarzinom, CRC) und genetischen Dispositionen zu finden und einen Test für den Nachweis dieser Disposition zur Verfügung zu stellen.

- Dies gelang durch das Auffinden neuer polymorpher UGT1A7-Allele, die mit UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4 bezeichnet wurden und die mit statistisch erstaunlicher Relevanz mit dem Auftreten eines Kolorektalkarzinoms (CRC) und darüberhinaus mit bestimmten entzündlichen Darmerkrankungen (IBD, inflammatory bowl disease; Morbus Crohn) sowie den Krebsarten Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Magen- und Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht werden können. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als UGT1A7 nicht im Dickdarm, d.h. nicht in der erkrankten Region exprimiert wird. Es ist erstaunlich und bei bisherigen Untersuchungen noch nicht so gefunden worden, dass eine genetische Prädisposition nicht von einer Expression im betroffenen Organ abhängt, sondern auch räumlich getrennt möglich ist. Hieraus ergibt sich, dass die genetische

- 4 -

Modifikation einen globalen und nicht nur einen organspezifischen Effekt besitzen muss. Ein solcher Zusammenhang konnte hier erstmals aufgezeigt werden.

Bei den genetischen Polymorphismen handelt es sich um solche der Keimbahn und nicht um somatische Mutationen des Tumors. Die zugrundeliegenden Analysen erfolgten an genomischer DNA aus Lymphozyten von Patienten mit Tumoren (CRC), entzündlicher Darmerkrankung (IBD) und Referenzpersonen, die diese Erkrankungen nicht aufwiesen. Die Analyse von insgesamt 111 Individuen kommt zu dem Ergebnis, dass die Polymorphismen an den einzelnen Kodons nicht unabhängig voneinander auftreten sondern nur kombiniert vererbt werden können.

UGT1A7*2 ist durch eine stille Mutation an Kodon 11 mit einem Austausch von C zu A an Position 3 (CCC zu CCA) gekennzeichnet. Diese Mutation fällt in die Signal-Peptid-Domäne des endoplasmatischen Retikulums. Hiermit verbunden ist eine zweite Mutation an Kodon 208, und zwar W208R, ein Austausch T zu C, der zu einer nicht-konservativen Substitution eines aromatischen Tryptophans zu einem positiv geladenen Arginin-Rest führt. Der Polymorphismus an Kodon 208 fällt in einen Sequenzbereich, der nicht nur in den ersten Exons von UGT1A7-10, sondern in allen Mitgliedern der UGT1A7-Familie konserviert ist. Die Anwesenheit eines RV-N-Sequenzmotivs zwischen Aminosäuren 206 und 209 ist allen UGT1A-Proteinen gemeinsam. Der W208R-Austausch in UGT1A7 repräsentiert die Wildtyp-Sequenz von UGT1A8 und UGT1A9. Die Untersuchungen der Anmelder zeigen, dass die Polymorphismen an Kodon 11 und an Kodon 208 nicht einzeln auftreten (bei einer Studie an 111 Personen). Die Charakterisierung an beiden Positionen heterozygoter Individuen und die Tatsache, dass keine individuell homozygoten Muster an Kodon 11 oder an Kodon 208 gefunden werden konnten, legen nahe, dass sich beide Austausche auf dem UGT1A7*2-Allel befinden.

UGT1A7*3 umfasst zwei Mutationen. Die erste ist ein T zu G-Tausch an Kodon 129, was einen konservativen Kodon-Austausch von Asparagin zu Lysin ergibt (N129K). Die zweite zeigt sich an Kodon 131 in einem doppelten Austausch von C zu A an Position 1 und G zu A an Position 2 des Kodons, was zu einem Arginin-zu-Lysin-Austausch führt (R131K). Dieser Polymorphismus beeinflusst ebenfalls stark konservierte Sequenzen des UGT-Proteins. Auf Leucin-127 folgend, das in allen

- 5 -

UGT1A7-Proteinen anwesend ist, ist ein LHN-L-Motiv (Aminosäuren 128-133) in UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4 und UGT1A5 konserviert. An Aminosäureposition 128-134 ist in UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 und UGT1A10 ein F-D-KLV-Aminosäuremotiv konserviert. Die Analyse der N129K- und R131K-Polymorphismen zeigte, dass diese Austausche nicht unabhängig voneinander auftreten. Es konnten homozygote UGT1A7*3-Allele identifiziert werden, was zeigt, dass die N129K/R131K-Mutationen auf einem einzelnen Allel identifiziert werden können, das unabhängig von UGT1A7*2 auftritt. Der N129/R131K-Polymorphismus von UGT1A7 entspricht der Wildtyp-Sequenz von UGT1A9 an diesen Kodons, was weiterhin nahelegt, dass die 3-Basenpaar-Mutationen als ein Haplotyp vererbt werden.

Das dritte Allel, UGT1A7*4, verbindet alle Veränderungen, die in UGT1A7*2 und UGT1A7*3 beobachtet werden. Es wurden Individuen mit homozygoten Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und 208 festgestellt, was anzeigt, dass alle 4 Polymorphismen auf einem einzelnen Allel vorkommen können. Es ist bemerkenswert, dass die Polymorphismen an den Kodons 11, 129, 131 oder 208 einzeln heterozygot oder homozygot auftraten.. Diese Beobachtung stützt auch wie oben ausgeführt die Annahme, dass die Polymorphismen an Kodons 11 und 208 und ebenfalls an Kodon 129 mit Kodon 131 als Haplotypen vererbt werden.

Auf Basis dieser Ergebnisse wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen und/oder für die Diagnose von Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen gelöst, bei welchem eine DNA-Probe einer zu untersuchenden Person auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A/-Allele, die Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 umfassen, getestet wird.

Dabei wird insbesondere ein positives Ergebnis für eine Mutation an Kodon 11 und Kodon 208 als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomerkrankungen, speziell für das Kolorektalkarzinom oder Kolonkarzinom (CRC) gewertet. Testmöglichkeiten hierfür sind nachfolgend angegeben. In Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass zusätzlich überprüft wird, dass die als positiv

- 6 -

gewerteten Mutationen ein W208R-Austausch und eine stille Mutation CCC zu CCA des Kodons 11 sind.

5 Ferner wird gemäß dieser Erfindung ein positives Ergebnis für eine Mutation an allen vier Kodons 11, 129/131 und 208 als Anzeichen für eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung, nämlich insbesondere die unter dem Begriff "inflammatory bowel disease" (IBD) und Colitis ulcerosa gefassten Erkrankungen, und eine Karzinomkrankung, speziell CRC, gewertet. In zugehörigen Tests kann vorgesehen sein, dass überprüft wird, dass die positiv gewerteten Mutationen
10 N129K, R131K und W208R sowie die stille Mutation CCC zu CCA an Kodon 11 sind.

Der identifizierte Zusammenhang von UGT1A7-Polymorphismen und dem kolorektalen Karzinom sowie den entzündlichen Darmerkrankungen, die ihrerseits
15 einen Risikofaktor der Kolonkarzinogenese bilden, ermöglichen den Einsatz der hier beschriebenen Marker zur Identifizierung von Risikopatienten für Tumorerkrankungen. Da die Detoxifikationsenzyme, an denen hier Polymorphismen nachgewiesen wurden, eine globale Funktion im menschlichen Organismus ausüben, ist eine Relevanz über das hier dargestellte kolorektale Karzinom
20 hinausgehend auch für andere Krebserkrankungen des Gastrointestinaltraktes, des Atemwegsystems, der Blutbildung und der Geschlechtsorgane und -drüsen wahrscheinlich.

Ein Vorteil der Erfindung besteht darin, dass Patienten frühzeitig in entsprechende
25 Risikogruppen eingeteilt und einer präventiven Behandlung zugeführt werden können, was zu einer Verbesserung der Früherkennung führt.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, dass das Verfahren auch für die Diagnose angewandt werden kann. Eine Verbesserung der Diagnose ist eine Möglichkeit noch
30 schneller einen klaren Befund über den Zustand der Patienten zu erhalten und dementsprechend frühzeitiger und zielgerichteter zu therapieren. Ein frühzeitiges erkennen und sofortige Therapie sind gerade bei Karzinomkrankungen von entscheidender Bedeutung. Das CRC ist bei früher Erkennung in den meisten Fällen vermeidbar oder heilbar.

- 7 -

Für eine Untersuchung wird vorzugsweise genomische DNA aus Lymphozyten verwendet. Die genomische DNA kann aus einer Blutprobe des Probanden mittels säulenchromatographischer Verfahren und chemischer Aufbereitung isoliert werden. Diese genomische DNA, die das Erbgut der zu untersuchenden Person repräsentiert, bildet die Grundlage aller weiteren genetischen Teststrategien.

Zunächst ist allgemein vorgesehen, dass die gewonnene Patienten-DNA mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird.

10 Hierfür kann in einer ersten Ausführungsform der Erfindung eine PCR-Amplifikation des gesamten Exons 1 des UGT1A7-Gens (ca. 855 Basenpaare) erfolgen, woran sich eine Sequenzanalyse anschließt. Die ermittelte Sequenz kann in geeigneter Weise ausgewertet, d.h. mit der Sequenz des Wildtyps und der für dieses Verfahren relevanten UGT1A7-Allele UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4 verglichen werden.

15 Gemäß einer anderen Ausführungsform werden nur gerade solche cDNA-Fragmente amplifiziert, die Aufschluss über die gesuchten Mutationen geben sollen. Vorzugsweise wird daher die DNA-Probe mit Hilfe spezifischer Primerpaare behandelt, von denen jeweils eines stromaufwärts und eines stromabwärts der relevanten mutierten DNA-Bereiche um die Kodons 11, 129/131 oder 208 binden, und in einer Polymerasekettenreaktion werden cDNA-Fragmente erzeugt, die entsprechenden Fragmenten des Wildtyp-Allels oder der polymorphen Allele gleichen, wobei das Vorliegen von Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 nachfolgend mit Hilfe von Sequenzierungs- und/oder Hybridisierungstechniken detektiert wird.

20 Vorzugsweise werden solche Primerpaare verwendet, die jeweils ca. 50 Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts des Kodons 11, des Kodons 129/131 sowie des Kodons 208 binden, wodurch etwa 100 bis 150 Basenpaare große cDNA-Fragmente erhalten werden.

30 Die Detektion der Polymorphismen kann mit Sequenzierungs- und/oder Hybridisierungsverfahren auf verschiedene Weise erfolgen. Der Fachmann ist hier grundsätzlich frei, aus den ihm bekannten Verfahren geeignete auszuwählen.

- 8 -

Unter anderem können die gesuchten Polymorphismen durch Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP) untersucht werden, indem die vollständige Rekombination eines mit der vorausgegangenen PCR erhaltenen Patienten-cDNA-Fragments mit einem jeweils entsprechenden cDNA-Fragment des Wildtyp-Allels zu Doppelsträngen detektiert wird. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf der Tatsache, dass eine variierte DNA-Sequenz nicht in der Lage ist komplett kongruente Doppelstränge mit der Wildtyp-Sequenz zu bilden. Dies kann für die Screening-Untersuchung gelelektrophoretisch dargestellt werden und zeigt die Existenz einer Mutation an. In einer Abwandlung dieser Methodik kann die Detektion der polymorphen cDNA-Fragmente durch Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) erfolgen.

Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen würde vorzugsweise durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung überprüft.

Eine weitere Detektionsmöglichkeit besteht darin, dass in einer rein PCR-basierten Strategie (amplification refractory mutation system, System der amplifizierungsresistenten Mutation) durch spezifische Primersequenzen, die an ihrem 3'-Terminus an den Basenaustausch des Polymorphismus binden, die Präsenz eines Polymorphismus dargestellt wird. Zugleich kann diese Methode modifiziert werden, heterozygote und homozygote Träger zu diskriminieren. Ein Ausführungsbeispiel dieser Methode als automatisierbares Testkit-System ist nachfolgend als Beispiel angegeben. Als Primer werden Oligonukleotide verwendet, die einerseits die Wildtyp-Sequenz und andererseits die polymorphe Sequenz binden, sowie korrespondierende Gegenprimer (anti sense Primer). Mit diesen entsteht immer nur dann ein PCR-Produkt, wenn der auf dem Primer kodierte Wildtyp oder das Primerkodierte polymorphe Allel vorliegt. Als Kontrollen werden definierte cDNAs eingesetzt, die die definierten Polymorphismen enthalten. Die Methode ist beispielsweise unter Einsatz der quantitativen Taqman-PCR automatisierbar.

Die PCR-Konjugate können auf übliche Weise mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzym-Markern nachgewiesen werden. Dem Fachmann stehen hierfür genügend

- 9 -

geeignete Techniken zur Auswahl, die hier nicht gesondert beschrieben werden müssen.

Die Erfindung umfasst auch Testkits bzw. Testanordnungen zur Durchführung des
5 erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die zu dieser Erfindung gehörige Testanordnung umfasst grundsätzlich zumindest die für das Verfahren erforderlichen genetischen Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das
10 Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge, wobei vorgesehen ist, dass die vorbereiteten und zusätzlich markierten DNA-Proben des zu untersuchenden Individuums in Kontakt mit der Testanordnung gebracht werden, an einem der Nachweisreagenzien binden und mit Hilfe des Markers an diesem Ort detektiert werden. Dabei kann die Markierung der Probanden-DNA durch
15 Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope erfolgen.

Für eine Kombinationsanalyse mehrerer UGT1A7-Polymorphismen, die in jedem Fall zweckmäßig ist, können die hierfür erforderlichen verschiedenen Nachweisreagenzien, d.h. z.B. die Primer für die verschiedenen Kodons 11,
20 129/131 und 208 oder die DNA-Fragmente von Wildtyp- und UGT1A7*2/3/4-Allele, je nach gewählter Strategie, gemeinsam auf einer Testanordnung, z.B. auf einem Genchip, immobilisiert sein.

Um das Ablesen des Ergebnisses zu erleichtern, ist es vorteilhaft, wenn auf dem
25 stationären Träger eine Beschriftung oder ein Aufdruck in Zuordnung zu den Nachweisreagenzien angeordnet ist.

Die Kombinationsanalyse aller UGT1A7-Polymorphismen kann über eine Genchiptechnik erfolgen. Dabei kann beispielsweise in der stationären Phase die
30 Oligonukleotid-Sequenz der Polymorphismen sowie des Wildtyps immobilisiert sein. Von der Probanden-DNA werden korrespondierende Oligonukleotide durch PCR amplifiziert und durch Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktive Isotope oder andere Konjugate markiert. Die nachfolgende Hybridisierungsreaktion identifiziert das korrespondierende Oligonukleotid auf dem Gen-Array und determiniert die Existenz

- 10 -

eines Polymorphismus. Verschiedene Ausführungen einer Array-basierten Teststrategie sind möglich und können vom Fachmann an dieses Verfahren angepasst werden.

- 5 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung können die polymorphen UGT1A7*2-, UGT1A7*3- und UGT1A7*4-Gene für die Herstellung zugehöriger UGT-Isotypen verwendet werden. Die identifizierten Polymorphismen können als rekombinante Proteine exprimiert und beispielsweise für die metabolische Charakterisierung von Tumortheraeutike eingesetzt werden, um eine Vorhersage des Metabolismus
- 10 dieser Substanzen zu ermöglichen. Ebenso können alle Polymorphismen von UGT1A7 dazu dienen, den Metabolismus von potentiell mutagenen oder krebserzeugenden Substanzen zu untersuchen, mit dem Ziel, Voraussagen über deren Giftigkeit oder karzinogenetische Potenz zu machen. Hierzu dient die Expression der polymorphen Allele in heterologen Expressionssystemen, in
- 15 Bakterien, Eukaryotenzellkulturen und ihr nachfolgender Einsatz als Enzympräparation für katalytische Analysen. Testkits, die eine Serie verschiedener Polymorphismen-Proteine beinhalten, ermöglichen hier eine einfache in vitro Analyse.
- 20 Die Identifikation von Suszeptibilitätsmarkern für das Kolonkarzinom und entzündliche Darmerkrankungen ermöglicht prinzipiell deren Einsatz für gentherapeutische Strategien. Grundsätzliche gentherapeutische Anwendungsmöglichkeiten sind dem Fachmann heute bereits bekannt, so dass verschiedene Umsetzungsmöglichkeiten offenstehen. Der Einsatz von UGT1A7
- 25 alleine oder in Kombination mit anderen homologen Mitgliedern dieser Enzymfamilie in der Tumorthherapie ist eine Anwendung der definierten genetischen Assoziation.

Die Erfindung umfasst daher auch die Verwendung von UGT1A7-Genen oder -genfragmenten für die Herstellung eines gentherapeutischen Arzneimittels zur

30 Behandlung bei UGT1A7-Polymorphismen des Typs UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4.

In Weiterbildung der Erfindung ist daher der orale oder parenterale Einsatz des rekombinanten Proteins von Genen der UGT1A-Familie in der Tumorthherapie oder

- 11 -

in der Tumorprävention bei Risikopatienten vorgesehen. Für den Transport von UGT1A7 cDNA oder homologer UGT1A cDNAs in humane Zellen und Tumorzellen können Vektoren verwendet werden, die dem Fachmann grundsätzlich bekannt sind und die er mit seinem fachmännischen Wissen auswählen kann. Dies führt zur

5 Expression des Proteins im Zielgewebe einschließlich von embryonalem oder fetalem Gewebe, wo das gentherapeutische UGT1A7-Arzneimittel für die Modifikation von Vorläuferzellen verwendet werden kann.

Der Transport der UGT1A-cDNA kann beispielsweise durch parenterale Vektoren

10 mit organspezifischen Promotoren, durch die intramuskuläre Injektion von UGT1A cDNA oder durch liposomverpackte cDNA über den Gastrointestinaltrakt erfolgen. Der Fachmann kann geeignete Delivery-Systeme im Rahmen seines Fachwissens aussuchen.

15 Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

BEISPIEL 1 - Testbeispiel

Es werden Oligonukleotide (Primer) verwendet, die einerseits die Wildtyp-Sequenz

20 und andererseits die polymorphen Sequenzen binden sowie korrespondierende Gegenprimer (anti sense Primer). Mit diesen entsteht immer nur dann ein PCR-Produkt, wenn der auf dem Primer kodierte Wildtyp oder das primerkodierte polymorphe Allel vorliegt. Das Prinzip ist in Figur 1 dargestellt. Als Kontrollen werden definierte cDNAs eingesetzt, die die definierten Polymorphismen enthalten.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

5

Polymorphismus	Primer Art	Sequenz	Produktgröße
Kodon 11	A	gggtggactggcctccttcca	269 bp
	B	gggtggactggcctccttccc	
	reverse	ggcaaaaaccatgaactcccg	
Kodon 129	A	ttttttcaaattgcaggagtttgtttaag	264 bp
	B	ttttttcaaattgcaggagtttgtttaat	
Kodon 131	A	aaattgcaggagtttgtttaaggacaa	271 bp
	B	aaattgcaggagtttgtttaatgaccg	
	reverse	ttctaagacattttgaaaaaataggg	
Kodon 208	A	gacgccatgactttcaaggagagagtac	252 bp
	B	gacgccatgactttcaaggagagagtat	
	reverse	tggtttccctgatgacagttgatacc	

Beim Einsatz dieser Primer in der automatisierten, quantitativen PCR werden Konjugate mit Fluoreszenzfarbstoffen, enzymatischen Markern oder anderen Markierungssystemen für DNA hergestellt und für diese Diagnostik genutzt. Die Markierungsmittel sind allgemein bekannt und werden hier nicht gesondert beschrieben.

Mit Hilfe dieses Testsystems wurden Ergebnisse gefunden, die spezifisch das Vorliegen homo- sowie heterozygoter Mutationen detektieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Kodon	Primer	Kontrollen		Ergebnisse				
		UGT1A7*1	UGT1A7*4	UGT1A7*2	UGT1A7*3	UGT1A7*2/ UGT1A7*1	UGT1A7*2/ UGT1A7*3	UGT1A7*3/ UGT1A7*4
11	A	-	+	+	-	+	+	+
	B	+	-	-	+	+	+	+
129	A	-	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	-
131	A	-	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	-
208	A	-	+	+	-	+	+	+
	B	+	-	-	+	+	+	+

Die Anwendung dieser Analysen für alle drei polymorphen Genorte 11, 129/131 und 208 ist deshalb von großer Bedeutung, da das Vorliegen des UGT1A7*2-Allels (Kodon 11 und 208) sowie des UGT1A7*4-Allels (Kodon 11, 129, 131, 208) mit dem kolorektalen Karzinom, aber nur das Vorliegen des UGT1A7*4 Allels mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind. Die genetische Analyse besteht daher zweckmäßigerweise aus der Kombination der Analysen an den identifizierten Orten im Sinne eines Testkits.

10

Testreihe an 111 Probanden

Die Proben wurden von 111 Patienten des Instituts für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover im Jahr 1999 gesammelt.

15

Die folgenden Gruppen wurden untersucht:

a) Die Kontrollgruppe (n = 54, 44,32 ± 15,65 Jahre, 31 männlich/23 weiblich) wurde definiert als Patienten die keinen Befund auf vorhergehende Krebserkrankungen hatten, ausgeschlossen durch abdominalen Ultraschall und Endoskopie (obere und untere).

20

b) Kolorektalkrebs-Patienten (n = 26, 62,15 ± 11,25 Jahre, 15 männlich / 11 weiblich) litten an Kolorektalkarzinom, wie durch Ausschluss nach den Amsterdam II-Kriterien bestätigt.

c) Die Beispiele für entzündliche Darmerkrankungen (IBD) (n = 31, 36,74 ± 11,79 Jahre, 14 männlich / 16 weiblich) umfassten Patienten mit Colitis ulcerosa (n = 14,

25

- 14 -

35,07 ± 13,86 Jahre, 9 männlich / 5 weiblich) und Morbus Crohn (n = 17, 38,12 ± 10,00 Jahre 5 männlich / 12 weiblich). Die Diagnosen der Colitis ulcerosa und von Morbus Crohn basieren auf Befunden oberer und unterer Endoskopie und wurden histologisch durch intestinale Biopsien bestätigt.

5

Genomische DNA: Die genomische DNA wurde aus Vollblutproben mit Hilfe des QuiaAmp® Systems nach den Empfehlungen des Herstellers präpariert (Quiagen, Hilden, Deutschland). Konzentrationsdaten wurden spektrophotometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt, und die Proben wurden in 10 mM Tris/EDTA- Puffer (pH 8,0) bei 4 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

10

Analyse der UGT1A7 Exon1 Sequenz: Die UGT1A7 Exon 1-Sequenz wurde mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Der Forward-Primer war von Basenpaar 61 bis 38 stromaufwärts des ATG-Startkodons (GenBank Zugangsnummer U39570) von UGT1A7 (5'-gcggctcgagccacttactatattataggagct-3'). Der Gegenprimer lag zwischen Basenpaar 855 und 829 (GenBank Zugangsnummer U89507) der UGT1A7 Exon1-Sequenz (5'-gcggatatccataggcactggctttccctgatgaca-3'). Die Lokalisierung des stromaufwärtigen Primers außerhalb des offenen Leserahmens war erforderlich um die Spezifität der Amplifikation zu erreichen, da die Exon1-Sequenz von UGT1A7-10 Homologien von 93 % besitzt. Ein 916 Basenpaare großes Produkt wurde in einem Volumen von 100 µl, enthaltend 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumsulfat, 1 % Triton X-100, 0,2 mM je dNTP, 20 ng genomische DNA, 2 µM Primer und 5 Einheiten VENT (exo-)DNA-Polymerase (NEB, Beverly, MA) amplifiziert. Nach einem heißen Start bei 94 °C für 3 Minuten wurden 30 Zyklen bei 94 °C über 3 Sekunden, bei 57 °C für 30 Sekunden und bei 72 °C für 30 Sekunden auf einem Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400 System gefahren. Die Produkte wurden in einer Elektrophorese mit 2% Agarosegel sichtbar gemacht und mit QuiaQuick® Säulen gemäß den Angaben des Herstellers (Quiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden an beiden Strängen mit automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung bestimmt (MWG-Biotech, Ebersbach, Deutschland). Die Sequenzdaten wurden mit dem PC-Gene-software-package (Oxford Molecular, Campbell, CA, U.S.A.) analysiert. Die statistische Analyse wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet.

15

20

25

30

- 15 -

GenBank Accession Numbers: UGT1A7*1: U89507; UGT1A7*2: AF2969226;
UGT1A7*3: AF292627, UGT1A7*4 AF292627

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Figuren näher erläutert, wobei im
5 Einzelnen zeigen:

- Figur 1 die graphische Darstellung der UGT1A7-Polymorphismus-Diagnostik;
- Figur 2 Assoziation von UGT1A7*2 und UGT1A7*4 mit NC, CRC und IBD;
- Figur 3 3 polymorphe Orte(Sites) der menschlichen UGT1A7 Exon 1 Sequenz;
- 10 Figur 4 Vergleich der Regionen um das Kodon 11, 129, 131 und 208;
- Figur 5 Assoziationen zwischen der W208R Mutation und dem Kolorektalem
Karzinom und entzündlichem Darmerkrankungen.

Figur 1 zeigt eine UGT1A7-Polymorphismus-Diagnostik, bei der die Region um die
15 identifizierten Polymorphismen durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert
wird. Dabei werden spezifische Primerpaare verwendet, die zirka 50 Basenpaare
stromaufwärts und stromabwärts des Kodons 11, des Kodons 129/131 sowie des
Kodons 208 binden. Bei dieser PCR werden 100 bis 150 bp große komplementäre
Desoxyribonukleinsäure-Fragmente (cDNAs) erzeugt, die dem Wildtyp-Allel
20 entsprechen oder die identifizierten Polymorphismen tragen.

Figur 2 zeigt die Analyse der Prävalenz der polymorphen UGT1A7-Allelen wie in
Figur 3 definiert. Diese Analyse, die auf den definierten polymorphen UGT1A7-Allelen
basiert zeigt eine Signifikante Assoziation von UGT1A7*4 und UGT1A7*2 mit
25 kolorektalem Krebs (CRC) und dem geringen Vorkommen von diesen Allelen in der
normalen Kontrollgruppe (NC). Im Gegensatz dazu sind entzündliche
Darmerkrankungen (IBD) nur mit der Anwesenheit von UGT1A7*4 assoziiert.
Weder für CRC noch für IBD wurde eine signifikante Assoziation mit dem
UGT1A7*3-Allel gefunden. Die Assoziation von Verbindungen der heterozygoten
30 UGT1A7*3/UGT1A7*4-Individuen mit CRC und IBD war jedoch signifikant.
Statistisch signifikante Vergleiche sind durch * angezeigt. UGT1A7*2 ist definiert als
eine Kombination von CCA an Kodon 11 und der W208R-Mutation. Dies beruht auf
der Beobachtung, dass die zwei Mutationen immer kombiniert und nicht individuell
heterozygot oder homozygot entweder an Kodon 11 oder Kodon 208 identifiziert

- 16 -

werden. UGT1A7*2 wurde nicht als homozygotes Allel detektiert. UGT1A7*3 ist nur durch die Kombination von N129K und R131K definiert. Diese Patienten waren entweder homozygot oder heterozygot sowohl für N129K als auch R131K. Das heterozygote UGT1A7*4 kann alternativ die Verbindung heterozygot
5 UGT1A7*2/UGT1A7*3 repräsentieren.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der 3 polymorphen Sites, die in der menschlichen UGT1A7 Exon 1 Sequenz identifiziert wurden. Die Mutation CCC/A an Kodon 11 ist still. An Kodon 129, 131 und 208 führen die Mutationen zu
10 Aminosäuresubstitutionen. Die Sequenzanalyse hat die Anwesenheit von 3 verschiedenen Polymorphismen aufgezeigt, die UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4 zugeordnet wurden. Der Austausch an Kodon 11 und 208 (UGT1A7*2) sowie die Polymorphismen an Kodon 129 und 131 (UGT1A7*3) kamen nicht einzeln vor.

15

Figur 4 zeigt, dass verglichen mit der Region um das Kodon 11 die identifizierten Polymorphismen an Position 129/131 und Position 208 in hochkonservierte Sequenzbereiche fallen. Der N129K/R131K Polymorphismus repräsentiert die Wildtyp-Sequenz von UGT1A9 in dieser Position. W208R repräsentiert die Wildtyp-
20 Sequenz von UGT1A8 und UGT1A9 an dieser Position.

Figur 5 zeigt, dass die Assoziation von W208R-Mutationen mit Kolorektalkarzinomerkrankungen und entzündlichen Darmerkrankungen hochgradig statistisch signifikant ist. Während Mutationen an Kodon 208 (W208R) nur in 22 %
25 der Normalkontrollen auftreten, finden diese sich in 73 % der Patienten mit kolorektalen Karzinomen und in 61 % der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen. Für das UGT1A7*2-Allel zeigte sich eine signifikante Assoziation mit dem kolorektalen Karzinom (19 % gegenüber 7 %) aber nicht mit entzündlichen Darmerkrankungen. Das UGT1A7*4-Allel war signifikant mit dem
30 kolorektalen Karzinom sowie auch mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert, während sich für UGT1A7*3 keine signifikante Assoziation zeigte (niedrige Signifikanzlevel). Die statistische Signifikanz für die Anwesenheit von W208R-Mutationen in CRC-Patienten (73%) gegenüber Normalkontrollen (22%) war sehr hoch ($p < 0,0001$) Hierbei wurden heterozygote (50% gegenüber 15%, $p < 0,001$)

- 17 -

und homozygote (23 % gegenüber 7 %, $p < 0,02$) W208R-Mutationen berücksichtigt. Die Assoziation war niedriger, jedoch ebenfalls signifikant für IBD-patienten, die 61 % W208R-Mutationen ($p < 0,0001$) zeigte, in 35 % heterozygoten und 26 % homozygoten Individuen. Bei dem Auftreten der W208R-Mutationen zu
5 22% bei den Normalkontrollen ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass ein tumorfreier Zustand zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme die spätere Entwicklung von CRC nicht ausschließt.

Der * zeigt signifikante Level gegenüber den Normalenkontrollen (Kruskal Wallis
10 Test). Im Folgenden bedeuten: n.s. - nicht signifikant, NC - Normalkontrollen; CRC – kolorektales Karzinom (colorectal carcinoma) und IBD – entzündliche Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease).

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für und/oder die Diagnose von Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen aufgrund genetischer Disposition, dadurch gekennzeichnet, dass eine DNA-Probe einer zu untersuchenden Person auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A7-Allele, die Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 umfassen, getestet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein positives Ergebnis für eine Mutation an Kodon 11 und 208 als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomerkrankungen, insbesondere für Dickdarm-, Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Magen- und Speiseröhrenkrebs gewertet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei überprüft wird, dass die als positiv gewerteten Mutationen ein W208R-Austausch und eine stille Mutation CCC zu CCA des Kodons 11 sind.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein positives Ergebnis für eine Mutation an Kodon 11, 129, 131 und 208 als Anzeichen für eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung und eine Karzinomerkrankung gewertet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei überprüft wird, dass die als positiv bewerteten Mutationen N129K, R131K und I208R sowie die stille Mutation CCC zu CCA an Kodon 11 sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass für die Probe genomische DNA, vorzugsweise aus Lymphozyten, verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die genomische Desoxyribonukleinsäure aus einer Blutprobe mittels säulenchromatographischer Verfahren und chemischer Aufbereitung isoliert wird.

- 19 -

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mit der DNA-Probe eine PCR-Amplifikation des Exons 1 von UGT1A7 (ca. 855 Basenpaare) mit anschließender Sequenzanalyse durchgeführt wird und die ermittelte Sequenz mit der des Wildtyps und der polymorphen Allele von UGT1A7 verglichen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zu der DNA-Probe mit Hilfe spezifischer Primerpaare, von denen jeweils eines stromaufwärts und eines stromabwärts der relevanten mutierten DNA-Bereiche um die Kodons 11, 129/131 oder 208 binden, in einer Polymerasekettenreaktion cDNA-Fragmente erzeugt werden, die entsprechenden Fragmente des Wildtyp-Allels oder der polymorphen Allele gleichen, und dass das Vorliegen von Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 mit Hilfe von Sequenzierungs- und/oder Hybridisierungstechniken detektiert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Primerpaare jeweils ca. 50 Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts des Kodons 11, des Kodons 129/131 sowie des Kodons 208 binden, wodurch etwa 100 bis 150 Basenpaare große cDNA-Fragmente gebildet werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorliegen von Mutationen an den relevanten Kodons durch Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP) mit einem jeweils entsprechenden cDNA-Fragment des Wildtyp-Allels detektiert wird, wobei Wildtyp- und polymorphe Allele vorzugsweise gelelektrophoretisch, weiter vorzugsweise mit Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE), unterschieden werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung überprüft wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass mit einer Polymerasekettenreaktion mit Hilfe von Primer-Sequenzen, die an

- 20 -

ihrem 3'-Terminus an den Basentausch des Polymorphismus binden, das Vorhandensein eines Polymorphismus nachgewiesen wird.

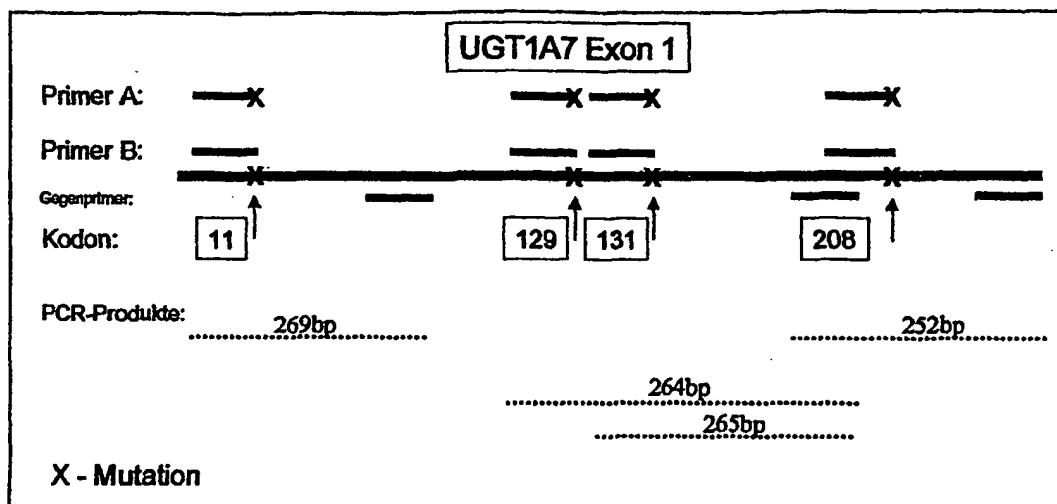
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorliegen von Mutationen mit Hilfe homologer Oligonucleotide mit der Wildtyp- oder der Polymorphismus-Sequenz und korrespondierenden Gegenprimern (anti sense primern) mit einer PCR-Technik nachgewiesen wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine quantitative Taqman-PCR verwendet wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die PCR-Konjugate mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzym-Markern nachgewiesen werden.
17. Testanordnung, umfassend die gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 erforderlichen genetischen Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge, wobei die gemäß in einem der Ansprüche 8 bis 10 vorbereitete(n) und zusätzlich markierten(n) DNA-Probe(n) eines zu untersuchenden Individuums bei Inkontaktbringen mit der Testanordnung an einem der Nachweisreagenzien bindet/binden und mit Hilfe des Markers an diesem Ort detektiert wird/werden.
18. Testanordnung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope erfolgt.
19. Testanordnung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweisreagenzien für eine Kombinationsanalyse mehrerer UGT1A7-Polymorphismen gemeinsam auf einer Testanordnung immobilisiert sind.
20. Testanordnung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem stationären Träger für das Ablesen des Ergebnisses eine

- 21 -

Beschriftung oder ein Aufdruck in Zuordnung zu den Nachweisreagenzien angeordnet ist.

21. Verwendung von polymorphen UGT1A7*2-, UGT1A7*3- und UGT1A7*4-Gene
5 für die Herstellung der von ihnen kodierten polymorphen UGT-Isoformen.
22. Verwendung der UGT-Isoformen nach Anspruch 21 für die metabolische
Charakterisierung von Tumortheraeutika sowie zur Untersuchung der Toxizität
und/oder Karzinogenität potentieller UGT1A7-Substrate.
10
23. Verwendung von UGT1A-Wildtyp-Genen oder -genfragmenten für die
Herstellung eines gentherapeutischen Arzneimittels zur Behandlung bei
UGT1A-Polymorphismen, insbesondere solchen des Typs UGT1A7*2 oder
UGT1A7*4.
15
24. Verwendung von rekombinanten UGT1A7-Enzymen für therapeutische Zwecke.

1/3



Figur 1

Allele		NC	CRC	IBD
UGT1A7*1	wildtype	48%	4%	6%
UGT1A7*2	+/+	0%	0%	0%
UGT1A7*2	+/-	5%	19%*	3%
UGT1A7*3	+/+	16%	0%	10%
UGT1A7*3	+/-	18%	23%	10%
UGT1A7*4	+/+	7%	23%*	26%*
UGT1A7*4	+/-	3%	19%*	16%*
UGT1A7*3/ UGT1A7*4	compound heterozygous	3%	12%	16%*
UGT1A7*4 (+/+) and UGT1A7*3/UGT1A7*4		10%	35%*	50%*

Figur 2

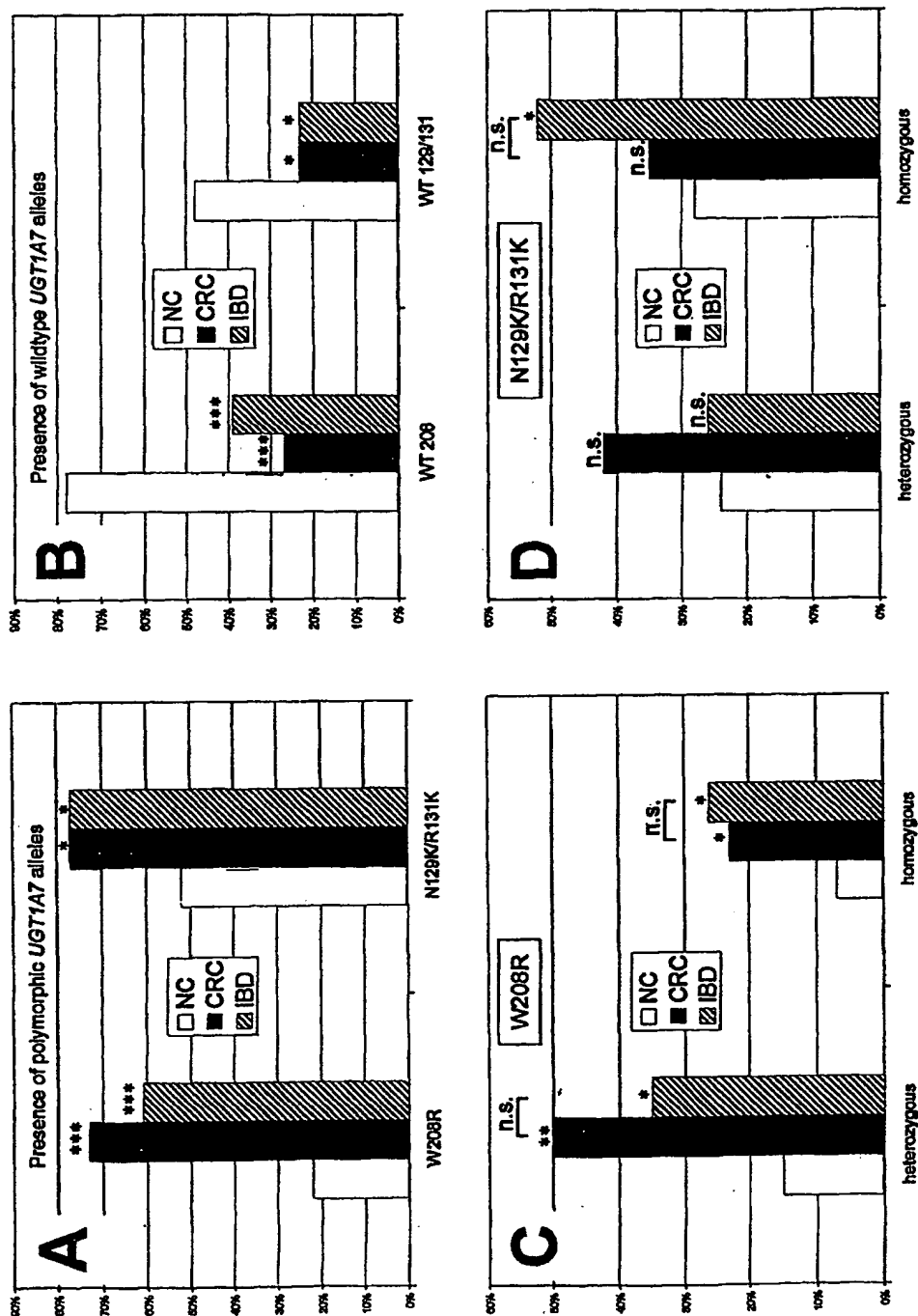
2/3

allele	codon no.	10	11	12	128	129	130	131	132	207	208	209	description
UGT1A7*1		CTT	CCC	CTA	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	GTA	TGG	AAC	WT
		L	P	L	F	N	D	R	K	V	W	N	
UGT1A7*2		CTT	CCA	CTA	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	GTA	CGG	AAC	W208R
		L	P	L	F	N	D	R	K	V	R	N	
UGT1A7*3		CTT	CCC	CTA	TTT	AAG	GAC	AAA	AAA	GTA	TGG	AAC	N129K/R131K
		L	P	L	F	K	D	K	K	V	W	N	
UGT1A7*4		CTT	CCA	CTA	TTT	AAG	GAC	AAA	AAA	GTA	CGG	AAC	N129K/R131K/W208R
		L	P	L	F	K	D	K	K	V	R	N	

Figur 3

aminoacid no.	aa 7 - 15	aa 127 - 134	aa 205 - 213
UGT1A1	GGRP-LVLG----	LLHNKELM----	QRVKNMLIA-
UGT1A3	VPLPWLATG----	LLHNEALI----	QRVKNMLYP-
UGT1A4	VPLPQLATG----	LLHNEALI----	QRVKNMLYP-
UGT1A5	VPLPRLATG----	LLHNEALI----	QRVKNMLYP-
UGT1A6	RSFORISAG----	LLQDRDTL----	QRVANFLVN-
UGT1A7	TGLLPYVC----	LFNDRKLV----	ERVWNHIMH-
UGT1A8	TSPIPLCVS----	LFNDRKLV----	ERVNRHIMH-
UGT1A9	TSPLPLCVC----	LFKDKKLV----	ERVNRHIMH-
UGT1A10	DQPRSEMCV----	LFNDRKLV----	ERVWNHIVH-
UGT1A7 polymorphisms:			
		N129K/R131K	W208R

Figur 4



$p < 0,0001^{***}$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,05^{*}$

Figur 5